



**The Kingdom of Thailand  
Ministry of Commerce  
Department of Intellectual Property**

**Certificate**

The attached documents are exact copies of the Thai Patent application described on the following page, as originally filed.

Application Number : 075425  
Filing Date : July 26 , 2002

Issued on July 10, 2003



(Mr. Yanyong Phuangrach)  
DIRECTOR GENERAL



คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

- ☒ การประดิษฐ์  
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์  
☐ อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้  
 ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522  
 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535  
 และพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่

วันรับคำขอ	26 ก.ค. 2545	เลขที่คำขอ	075425
วันยื่นคำขอ			
สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ			
ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์			
ประเภทผลิตภัณฑ์			
วันประกาศโฆษณา		เลขที่ประกาศโฆษณา	
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร		เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	
ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่			

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์  
 "เชื้อไวรัสเด็งกีดัดแปลง สายพันธุ์ MBU 01-2002"

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่  
 ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)  
 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ  
 111 ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง  
 จังหวัดปทุมธานี 12120 และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย เลขที่ 979  
 อาคาร SM Tower ชั้น 14 ถ.พหลโยธิน สามเสนใน พญาไท กทม. 10400

3.1 สัญชาติ ไทย  
 3.2 โทรศัพท์ 02-564-7000  
 3.3 โทรสาร 02-564-7003  
 3.4 อีเมล ips@nstda.or.th

4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

- ☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☒ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5. ตัวแทน (ถ้ามี) ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์)  
 นายเกรียงศักดิ์ ก้อนทอง และ/หรือ นายกนกศักดิ์ ทองพานิชย์ และ/หรือ นายเฉลิมชัย  
 กักเกียรติกุล และ/หรือนางวราภรณ์ วิษุวัตน์ และ/หรือ น.ส. อรุณศรี ศรีธนะอิทธิพล  
 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ  
 111 ถ.พหลโยธิน อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

5.1 ตัวแทนเลขที่ 383,1046,1468,1193,1463  
 5.2 โทรศัพท์ 02-564-7000  
 5.3 โทรสาร 02-564-7003  
 5.4 อีเมล ips@nstda.or.th


6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)  
 อยู่ที่บ้าน 3

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม

ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร  
 เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ

- ☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม้อาจระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียด  
 เพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

8. การยื่นคำขออนุญาตออกฉาย				
วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการ ประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				
8.4 <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย <input type="checkbox"/> ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ <input type="checkbox"/> ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้				
9. การแสดงการประดิษฐ์ หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด วันแสดง วันเปิดงานแสดง ผู้จัด				
10. การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ				
10.1 เลขทะเบียน		10.2 วันที่ฝากเก็บ		สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ
11. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำ เป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอเป็นภาษา <input type="checkbox"/> อังกฤษ <input type="checkbox"/> ฝรั่งเศส <input type="checkbox"/> เยอรมัน <input type="checkbox"/> ญี่ปุ่น <input type="checkbox"/> อื่น ๆ				
12. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียนและประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่ เดือน พ.ศ. <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข ในประกาศโฆษณา				
13. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย ก. แบบพิมพ์คำขอ 3 หน้า ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 4 หน้า ค. ข้อถ้อยสิทธิ 1 หน้า ง. รูปเขียน - รูป - หน้า จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์ <input type="checkbox"/> รูปเขียน - รูป - หน้า <input type="checkbox"/> ภาพถ่าย - รูป - หน้า ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์ 1 หน้า			14. เอกสารประกอบคำขอ <input type="checkbox"/> เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร <input type="checkbox"/> หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบ ผลิตภัณฑ์ <input type="checkbox"/> หนังสือมอบอำนาจ <input type="checkbox"/> เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ <input type="checkbox"/> เอกสารการขอรับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่น คำขอในประเทศไทย <input type="checkbox"/> เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ <input checked="" type="checkbox"/> เอกสารอื่น ๆ เอกสารขอผ่อนผันหนังสือมอบอำนาจและ	
15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า <input checked="" type="checkbox"/> การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน <input type="checkbox"/> การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก				
16. ลายมือชื่อ ( <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร / อนุสิทธิบัตร; <input checked="" type="checkbox"/> ตัวแทน) <div style="text-align: right;"> (นายเฉลิมชัย กีกเกียรติกุล) ตัวแทนผู้รับมอบอำนาจ</div>				

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่  
เพื่อให้ได้ไปรับสิทธิหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

ชื่อผู้ประดิษฐ์ และที่อยู่

1. นางพูนสุข กีฬาแปง  
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ  
113 ถนนพหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120
2. นายนพพร สิทธิสมบัติ  
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200
3. นายวัชรระ กลินฤกษ์  
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200
4. นายปรีดา มาลาสิทธิ์  
คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700



## รายละเอียดการประดิษฐ์

### ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

เชื้อไวรัสเด็งกีดัดแปลงสายพันธุ์ MBU 01-2002

### ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์โดยย่อ

- 5 การประดิษฐ์นี้คือ เชื้อไวรัสไข้เลือดออกเด็งกีซึ่งถูกดัดแปลงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน prM โดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม จนส่งผลให้เชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้มีระดับโปรตีน prM บนผิวอนุภาคที่ถูกปล่อยออกนอกเซลล์ลดลง และมีความสามารถในการเพิ่มปริมาณในเซลล์เพาะเลี้ยงต่ำกว่าเชื้อไวรัสที่พบในธรรมชาติ ซึ่งก่อให้เกิดโรคไข้เลือดออกในคน

### 10 สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ พันธุวิศวกรรม และ จุลชีววิทยา

### ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- เชื้อไวรัสเด็งกี เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคไข้เลือดออกในคน โรคนี้แพร่ระบาดทั่วไปในประเทศไทย และประเทศในแถบเขตร้อน การติดเชื้อไวรัสเด็งกีนี้มีอยู่หลายเป็นพาหะ เชื้อไวรัสสามารถจัดเป็น 4 กลุ่ม  
15 ด้วยคุณสมบัติทางชีววิทยา การติดเชื้อครั้งแรกมักก่อให้เกิดโรคที่ไม่รุนแรงและชักนำให้ผู้ติดเชื้อสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสชนิดนั้น ๆ แต่การติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสเด็งกีกลุ่มอื่น ๆ มักทำให้ผู้ได้รับเชื้อมีอาการไข้ มีเลือดออกตามผิวหนังและอวัยวะภายในจนอาจถึงแก่ความตายได้ การป้องกันจำเป็นต้องสร้างภูมิคุ้มกันให้ร่างกายต่อเชื้อไวรัสทั้ง 4 กลุ่มได้

- เชื้อไวรัสเด็งกีอยู่ในตระกูล Flaviviridae อนุภาคเป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 50  
20 นาโนเมตร ผิวนอกเป็นชั้นของไขมันที่มีโปรตีนของไวรัสสองชนิดฝังอยู่โดยรอบ เรียกว่าโปรตีน envelope หรือโปรตีน E และโปรตีน matrix หรือโปรตีน M ภายใต้ชั้นไขมันมีโปรตีน capsid หรือโปรตีน C ทำหน้าที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไว้ภายใน สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเด็งกีเป็น RNA ยาวประมาณ 10.7 กิโลเบส จำนวน 1 สาย ซึ่งมีข้อมูลกำหนดการสร้างโปรตีนทั้งหมดของไวรัสทั้งในส่วนที่เป็นโปรตีนโครงสร้างของไวรัส (E, prM/M และ C) และโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง แต่มีส่วนช่วยในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสใน  
25 เซลล์ อนุภาคของไวรัสเด็งกีที่สร้างขึ้นใหม่ในเซลล์จะมีโปรตีน prM และโปรตีน E ที่ผิวนอก ระหว่างที่ไวรัสถูกขนส่งออกจากเซลล์ โปรตีน prM บนอนุภาคจะถูกเปลี่ยนไปเป็นโปรตีน M โดยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม furin ที่มีอยู่ใน Golgi apparatus ส่งผลให้ได้อนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์พร้อมที่จะเพิ่มจำนวนในเซลล์ใหม่

- เนื่องจากเชื้อไวรัสเด็งกีสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ไม่มากนัก การผลิตวัคซีนโดยใช้เชื้อไวรัสที่ถูกทำให้ตายแล้ว (inactivated) ก่อนนำไปฉีดเข้าไปในคน เพื่อกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมา  
30 จึงไม่เป็นที่นิยม เพราะภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นมักเกิดในช่วงเวลาสั้น ๆ และจำเป็นต้องฉีดกระตุ้นหลายเข็ม จึงจะได้ผล วิธีที่ได้มีการศึกษามากจึงมักมีการดัดแปลงสารพันธุกรรมของไวรัสเพื่อให้เชื้อไวรัสอ่อนกำลังลง (attenuated) ซึ่งมักอาศัยปริมาณไวรัสในระดับต่ำในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน การสร้างเชื้อไวรัสที่อ่อน

กำลังลงมักทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสหลาย ๆ รอบ ( serial passage) ในห้องปฏิบัติการจนเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในตำแหน่งที่สำคัญและส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส ในปัจจุบันเชื้อไวรัสเด็กที่มีศักยภาพที่ดีที่สุดสำหรับนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก คือ สายพันธุ์ PDK-53 เป็นเชื้อไวรัสเด็กที่ถูกกลายพันธุ์มาจากสายพันธุ์ 16681 โดยผ่านการเพาะเลี้ยงใน certified primary dog kidney (PDK) cell เป็นจำนวน 53 รอบ ทำให้ได้เชื้อไวรัสที่มีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ LLC-MK2 ได้ลดลง และสามารถเพิ่มจำนวนที่อุณหภูมิสูงได้ไม่ดี การศึกษาลำดับเบสของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส PDK-53 นี้ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งสำคัญอยู่เพียง 3 ตำแหน่ง จึงเป็นการเสี่ยงสำหรับผู้ที่จะได้รับวัคซีนที่มีองค์ประกอบของเชื้อไวรัสดังกล่าว เพราะเชื้อไวรัสมีโอกาสกลายพันธุ์กลับไปเป็นเชื้อไวรัสก่อให้เกิดโรคที่มีอาการรุนแรงขึ้นอีกได้โดยง่าย

การประดิษฐ์นี้จึงได้พัฒนาเชื้อไวรัสเด็กสายพันธุ์ MBU 01-2002 ขึ้นใหม่ โดยอาศัยเทคนิคพันธุวิศวกรรมในการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มกรดอะมิโนถึง 9 ตำแหน่งในบริเวณที่มีความสำคัญต่อขบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส โดยเฉพาะที่ขั้นตอนย่อย (maturation) ของเชื้อไวรัส กล่าวคือเป็นบริเวณของโปรตีน prM ที่จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ furin จนเปลี่ยนไปเป็นโปรตีน M ในอนุภาคที่สมบูรณ์ของไวรัส การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าวส่งผลให้ประสิทธิภาพของการสร้างไวรัสที่สมบูรณ์ถูกปรับเปลี่ยนไป ทำให้ได้ไวรัสที่มีปริมาณโปรตีน prM บนผิวของอนุภาคลดน้อยลง แต่มีความสามารถในการชักนำให้เซลล์ยูที่ติดเชื้อเกิดการหลอมรวมตัวกันได้มากกว่าเชื้อไวรัสต้นตอ นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อไวรัสที่ได้มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ลดต่ำลงคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์ PDK-53 ข้อดีของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่นี้คือ โอกาสในการกลายพันธุ์จนกลับไปมีรหัสพันธุกรรมเหมือนเชื้อไวรัสต้นตอได้ยาก เพราะต้องเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเป็นจำนวนมากในบริเวณดังกล่าว ทำให้เชื้อไวรัสที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้มีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นแอนติเจนในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันหรือพัฒนาเป็นวัคซีนในคนเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็กที่ หรือการเกิดโรคไข้เลือดออกได้อย่างปลอดภัย

#### การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

เชื้อไวรัสเด็กสายพันธุ์ MBU 01-2002 ถูกสร้างขึ้นโดยการดัดแปลงสารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสต้นตอ สายพันธุ์ 16681 ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่แยกจากผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกชาวไทย การเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนถูกออกแบบให้มีการเปลี่ยนแปลงในส่วนที่กำหนดการสร้างโปรตีน prM บริเวณหน้าต่อตำแหน่งตัดของเอนไซม์ furin (prM-M junction) โดยมีขั้นตอนการประดิษฐ์ดังนี้

1. ทำการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ตำแหน่ง 666 เปลี่ยนจาก T ไปเป็น A, ตำแหน่ง 709 เปลี่ยนจาก A ไปเป็น G และ ตำแหน่ง 714 เปลี่ยนจาก A ไปเป็น C ใน cDNA ของเชื้อไวรัสเด็กที่ โดยการทำให้มี restriction enzyme recognition sequence สำหรับเอนไซม์ Nde I และ BamHI เพิ่มขึ้นมาที่ตำแหน่ง 666 และ 709 ของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตามลำดับ
2. ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขึ้นมาสองสาย ให้มีลำดับเบสดังต่อไปนี้  
 5' TATGGACGGTGACGCGGACCGAGGCATTCCAAGAGATCTAGGA 3' (sense primer)  
 5' GATCTCCTAGATCTCTTGAATGCCTGGTCCGCGTGCTCCGTCCA 3' (anti-sense primer)

3. นำโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นทั้งสองสายมาผสมกันในสภาวะที่เหมาะสม จะได้ดีเอ็นเอเส้นคู่สายสั้น ๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งสามารถเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ Nde I อีกด้านสามารถเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ BamHI นำสายดีเอ็นเอดังกล่าวนี้ไปเชื่อมกับพลาสมิดดีเอ็นเอที่มี Dengue cDNA (จากข้อ 1) และถูกกำจัดเอาชิ้นดีเอ็นเอตั้งแต่ลำดับเบสที่ 666 ถึง 709 ออกแล้วด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ NdeI และ BamHI
4. จากนั้นทำการเตรียมพลาสมิดที่มี cDNA กำหนดการสร้างสารพันธุกรรมทั้งจีโนมของเชื้อไวรัสตัวใหม่ (full-length cDNA clone) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโนดังต่อไปนี้
  - 4.1 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 193 เปลี่ยนจาก threonine ไปเป็น arginine
  - 4.2 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 196 เปลี่ยนจาก threonine ไปเป็น arginine
  - 4.3 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 197 เปลี่ยนจาก methionine ไปเป็น threonine
  - 4.4 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 198 เปลี่ยนจาก glycine ไปเป็น arginine
  - 4.5 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 199 เปลี่ยนจาก glutamic acid ไปเป็น histidine
  - 4.6 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 200 เปลี่ยนจาก histidine ไปเป็น serine
  - 4.7 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 201 เปลี่ยนจาก arginine ไปเป็น lysine
  - 4.8 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 203 เปลี่ยนจาก glutamic acid ไปเป็น serine
  - 4.9 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 204 เปลี่ยนจาก lysine ไปเป็น arginine

จะได้สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเด็กกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 (full-length cDNA clone) ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนที่ prM-M junction จนปราศจากกรดอะมิโนที่มีประจุลบภายใน 13 กรดอะมิโนหน้าต่อจุดตัดนี้ และมีกรดอะมิโนที่มีประจุบวกเพิ่มมากขึ้นอีก 3 หน่วยประจุ
5. ทำการสร้าง RNA จากแม่แบบ cDNA (ข้อ 4) ในหลอดทดลอง ด้วยการทำงานของเอนไซม์ SP6 RNA polymerase ในสภาวะที่มี Cap analog ในความเข้มข้น 4 mM โดยประมาณ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
6. นำ RNA ที่สร้างขึ้นในหลอดทดลองไปสกัดแยกให้บริสุทธิ์ขึ้น ก่อนที่จะนำไปเหนี่ยวนำเข้าสู่เซลล์ยุงเพาะเลี้ยง C6/36 โดยใช้ lipofectin เป็นตัวช่วยพา เลี้ยงเซลล์ยุงเพาะเลี้ยง C6/36 ไว้ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส และตรวจพบเชื้อไวรัสที่เพิ่มจำนวนในเซลล์ ปล่อยออกมาจากเซลล์ และลอยอยู่น้ำเพาะเลี้ยงเซลล์หลังจากการเหนี่ยวนำ RNA เข้าไปในเซลล์ โดยเริ่มตรวจพบตั้งแต่วันที่ 2 เป็นต้นไปและมีปริมาณสูงประมาณวันที่ 7 จึงได้เก็บไวรัสในน้ำเพาะเลี้ยงไว้ โดยผสมน้ำเพาะเลี้ยงกับ fetal bovine serum ให้ได้ความเข้มข้น 20% โดยประมาณ และแช่ไวรัสไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
7. ตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรมเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่อยู่ในน้ำเพาะเลี้ยง พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนตามที่ได้ออกแบบไว้ทุกประการ
8. สภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณไวรัสสายพันธุ์ใหม่คือ นำเชื้อไวรัสมาผสมกับเซลล์ยุงเพาะเลี้ยง C6/36 ในอัตราส่วนไวรัส/เซลล์เท่ากับ 1 - 10 อนุภาค/100 เซลล์ ในปริมาตร 1 - 2 มล แล้วปล่อยให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำเพาะเลี้ยงให้มีปริมาตร 5 - 15 มล และเลี้ยงเซลล์ยุงเพาะเลี้ยง C6/36 ไว้ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เก็บเชื้อไวรัสที่

ปล่อยออกมาจากเซลล์ในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อมีปริมาณสูงไวรัสเพียงพอ โดยผสมน้ำเพาะเลี้ยงกับ fetal bovine serum ให้ได้ความเข้มข้น 20% โดยประมาณ และแช่ไวรัสไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

9. คุณลักษณะของเชื้อไวรัสเด็กที่สายพันธุ์ MBU 01-2002 ที่พัฒนาขึ้นใหม่มีดังนี้

- 5 9.1 เชื้อไวรัสเด็กที่สายพันธุ์ MBU 01-2002 ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนที่ prM-M junction จนปราศจากกรดอะมิโนที่มีประจุลบภายใน 13 กรดอะมิโนหน้าต่อจุดตัดนี้ และ มีกรดอะมิโนที่มีประจุบวกเพิ่มมากขึ้นอีก 3 หน่วยประจุ
- 9.2 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ MBU 01-2002 มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ต่ำกว่าเชื้อต้นตอประมาณ 10-1000 เท่า ทั้งในเซลล์ยุง C6/36, เซลล์ไคสุกร PS clone D, 10 เซลล์ไคลิง Vero และ เซลล์คน HEK 293T
- 9.3 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ MBU 01-2002 มีโปรตีน prM ที่ผิวด้านนอกของอนุภาคในปริมาณต่ำกว่าเชื้อไวรัสต้นตอ และโปรตีน prM ที่คงเหลือประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุบวกเพิ่มมากกว่าเชื้อไวรัสต้นตอ
- 15 9.4 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ MBU 01-2002 สามารถชักนำให้เซลล์ยุงเพาะเลี้ยง C6/36 ที่มีเชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนอยู่เกิดการหลอมรวมตัวกันเป็นเซลล์ที่ใหญ่ขึ้น ทั้งในสภาวะที่เป็นกลาง (pH 7.0) และสภาวะที่เป็นกรด (pH < 7.0) ในขณะที่เชื้อไวรัสต้นตอจำเป็นต้องอาศัยสภาวะที่เป็นกรด (pH < 7.0) เท่านั้น
- 20 9.5 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ MBU 01-2002 สามารถชักนำให้เซลล์ยุงเพาะเลี้ยง C6/36 หลอมรวมตัวได้ดีที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส แต่ความสามารถดังกล่าวลดต่ำกว่าเชื้อต้นตอเมื่อศึกษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการหลอมรวมตัวกันนี้เป็นกลไกหนึ่งทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อตายเร็วขึ้น เมื่อเซลล์ที่ติดเชื้อถูกทำลาย ทำให้จำนวนไวรัสลดลง
- 9.6 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ MBU 01-2002 มีความสามารถในการจับกับเซลล์ไคสุกรและเซลล์คนได้ไม่แตกต่างจากเชื้อไวรัสต้นตอ
- 25 9.7 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ MBU 01-2002 มีความสามารถในการเข้าเพิ่มจำนวนในเซลล์ยุงและเซลล์ไคสุกรไม่ต่างกับเชื้อไวรัสต้นตออย่างมีนัยสำคัญ
- 9.8 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ MBU 01-2002 สามารถเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ไคสุกรเพาะเลี้ยงได้ดีเท่า ๆ กับเชื้อไวรัสต้นตอแต่ถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ในปริมาณต่ำกว่า

**กรรมวิธีการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด**

กรรมวิธีการประดิษฐ์ที่ได้กล่าวมาข้างต้นเป็นวิธีการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด



### ข้อถกเถียง

1. เชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนที่ prM-M junction จนปราศจากกรดอะมิโนที่มีประจุลบภายใน 13 กรดอะมิโนหน้าต่อจุดตัดนี้ และมีกรดอะมิโนที่มีประจุบวกเพิ่มมากขึ้นอีก 3 หน่วยประจุ
- 5 2. เชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ตามข้อถกเถียงที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ มีระดับโปรตีน prM บนผิวอนุภาคที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์น้อยกว่าเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์อื่น
3. เชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ตามข้อถกเถียงที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ มีความสามารถในการชักนำให้เซลล์ยูที่ติดเชื้อเกิดการหลอมรวมตัวมากกว่าเชื้อต้นตอที่อุณหภูมิประมาณ 29 องศาเซลเซียส แต่ความสามารถนี้ลดต่ำลงที่ 40 องศาเซลเซียส
- 10 4. เชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ตามข้อถกเถียงที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ จะถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ที่ติดเชื้อได้น้อยกว่าเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์อื่น และทำให้ระดับของไวรัสในเซลล์ต่ำกว่าปกติ
5. เชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ตามข้อถกเถียงที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ มีความสามารถในการจับกับเซลล์ไตสุกรและเซลล์คนได้ไม่แตกต่างจากเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์อื่น
6. เชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ตามข้อถกเถียงที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ มีความสามารถในการเข้าเพิ่มจำนวนในเซลล์ยูและเซลล์ไตสุกรไม่ต่างกับเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญ
- 15 7. เชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 ตามข้อถกเถียงที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ สามารถเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ไตสุกรเพาะเลี้ยงได้ดีเท่าๆ กับเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์อื่น แต่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ได้ในปริมาณต่ำกว่า
8. Full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสเด็งกีที่ได้ทำการเปลี่ยนแปลงตามข้อถกเถียงที่ 1

## บทสรุปการประดิษฐ์

เชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ MBU 01-2002 เป็นเชื้อไวรัสไข้เลือดออกเด็งกี ซึ่งถูกดัดแปลงโดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมทำให้ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน prM ถูกเปลี่ยนแปลงจนส่งผลให้ไวรัสสายพันธุ์นี้มีระดับโปรตีน prM บนผิวอนุภาคที่ถูกปล่อยออกนอกเซลล์ในปริมาณลดต่ำกว่าเชื้อไวรัสต้นตอ โดยสามารถชักนำให้เซลล์ยูงที่ติดเชื้อหลอมรวมตัวที่ภาวะเป็นกลางได้มากกว่าเชื้อไวรัสต้นตอ และสามารถเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ได้ในระดับปกติ แต่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ได้น้อยกว่าเชื้อไวรัสต้นตอซึ่งก่อให้เกิดโรคไข้เลือดออกในคน